

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12)特許公報 (B2)

(11)特許番号

第2576970号

(45)発行日 平成9年(1997)1月29日

(24)登録日 平成8年(1996)11月7日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> C12N 15/09 1/21 //(C12N 1/21 C12R 1:125 ) (C12N 1/21	識別記号 9162-4B 7804-4B	序内整理番号 F I C12N 15/00 1/21	技術表示箇所 A
--	----------------------------	-------------------------------------	-------------

発明の数1 (全14頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願昭60-278850	
(22)出願日	昭和60年(1985)12月11日	
(65)公開番号	特開昭61-139392	
(43)公開日	昭和61年(1986)6月26日	
(31)優先権主張番号	5940/84	
(32)優先日	1984年12月12日	
(33)優先権主張国	デンマーク(DK)	
微生物の受託番号	N C I B	1 2 0 2 9
微生物の受託番号	N C I B	1 2 0 3 0
微生物の受託番号	N C I B	1 2 1 8 1

(73)特許権者	9 9 9 9 9 9 9 9 ノボ ノルディスク アクティーゼルス カブ デンマーク国, 2880 バグスバエル ト, ノボ アレ(番地なし)
(72)発明者	ベルジエ クラグ デイデリヒセン デンマーク国, ディーケー-2900 ヘレラツブ, エステルスベイ, 32
(74)代理人	弁理士 青木 朗 (外3名)

審査官 佐伯 裕子

最終頁に続く

## (54)【発明の名称】形質転換された細菌による所望産物の製造方法

1

## (57)【特許請求の範囲】

【請求項1】形質転換された細菌を適当な栄養培地中で培養し、培養物から所望産物を回収することを含んで成る所望産物の製造方法において、前記細菌は染色体dal遺伝子中に欠陥を有し、該細菌はdal<sup>-</sup>遺伝子を含有する発現ベクターを含み、それによって該細菌の該染色体欠陥により生ずる該細菌の要求性を補完することができ、そして該発現ベクターは前記所望産物をコードするDNA配列をさらに含有している、ことを特徴とする方法。

【請求項2】細菌がバチルス属の種である特許請求の範囲第1項記載の方法。  
10

【請求項3】バチルス属の種が枯草菌である特許請求の範囲第2項記載の方法。

【請求項4】細菌が腸内細菌種である特許請求の範囲第1項記載の方法。

2

## 【請求項5】腸内細菌種が大腸菌である特許請求の範囲第4項記載の方法。

【請求項6】前記dal遺伝子の欠陥が該dal遺伝子の突然変異であるか、又は該dal遺伝子中の少なくとも一部分の欠失である、特許請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項7】前記dal遺伝子の欠陥が、Dal<sup>-</sup>表現型の発現に必要なdal遺伝子の一部分と、dal遺伝子の一部分であるか否かに拘らず、該Dal<sup>-</sup>表現型の発現に必要なdal遺伝子の一部分に直接に接しているDal<sup>-</sup>表現型の発現に不要なDNAとの両方の欠失である、特許請求の範囲第5項又は第6項記載の方法。

【請求項8】前記発現ベクターが、枯草菌由来のdal遺伝子の機能的部を有するプラスミドまたはバクテリオファージである特許請求の範囲第1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は、収率増加または醸酵製品の品質向上の目的で抗生物質または他の不所望な成分を増殖培地へ添加することが不要な、培養の間に細菌の染色体外遺伝体を安定化する新規方法に関する。

## 〔従来技術および発明が解決しようとする問題点〕

染色体外性遺伝体、たとえばプラスミドを含む微生物は、一般に、遺伝子がしばしば非可逆的に損なわれうるという意味で不安定であると言われている。この不安定性は、プラスミドが宿主微生物に固有のものでない場合たとえばこれが他の生物からの遺伝子からなるかまたは遺伝子スプライシングにより構築される場合、特に助長される。

プラスミドの安定性を増すために、染色体ではなくプラスミドが耐性を与える抗生物質または他の生物活性化合物が、微生物の培養に用いられる培地へ通常添加される。このような培地においては、抗生物質耐性遺伝子を有するプラスミドを保持する細胞のみが増殖する。この方法の主な欠点は、抗生物質耐性菌の大規模増殖と、環境に対し好ましくない作用を有する可能性のある増殖培地に対し高価な抗生物質の添加と、それに統いて大規模精製により所望の生成物から抗生物質を除去することが必要であるということである。

宿主染色体の栄養要求性突然変異の相補性はプラスミド安定化の別の公知方法である。しかしながら、この方法は増殖培地の組成を厳しく制限し、宿主微生物に要求される栄養を含まない増殖培地での培養を必要とし、これにより生産性向上のために入手しうる機会を制限する。

本発明の目的は、抗生物質の使用を必要とすることなく、また増殖培地の組成を厳しく制限することなく、形質転換細菌における染色体外遺伝体を安定化する方法を提供するものである。

本発明の他の目的は、安定化された染色体外遺伝体とこのような安定化染色体遺伝体を含む形質転換細菌を提供するものである。

本発明の他の目的は、抗生物質を使用する必要がなくまたは増殖培地の組成を特別制限することなく形質転換細菌に所望の産物を製造する方法を提供するものである。

本発明のその他の目的は、関係する技術分野における当業者にとって明らかであろう。

## 〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、与えられた条件下で染色体外遺伝体が宿主の正常増殖に必要である一定の機能を有する場合には、通常の培地で培養する間に宿主細菌において染色体外遺伝体が保持されうるという発見に基づく。

与えられた条件下で宿主の正常増殖に必要とされる機能をコード化する遺伝子に突然変異、欠失または他の欠陥を有する宿主細菌を、たとえばこの機能をコード化す

る遺伝子を有するプラスミドで形質転換すると、プラスミドで形質転換されプラスミドを保持する細菌のみが、宿主細菌の要求がプラスミドで補なわれるために生残するであろう。しかしながら、プラスミドから染色体への遺伝情報の転換が行なわれなかったり、宿主細菌のこのような要求のない突然変異体への自然突然変異速度がわずかである場合、プラスミドの永久的維持が保証されるだけである。

本発明の第一の面によれば、培養の間に細菌における染色体外遺伝体を安定化する方法を提供するものであり、該方法は、

細胞エンベロープの合成または維持に必要な構造的または機能的成分をコード化するDNA列を含む染色体外遺伝体を提供し；

このような構造的または機能的成分に対する染色体遺伝子に欠陥を有する宿主細菌を前記DNA列を含む染色体外遺伝体で形質転換し；

これにより宿主細菌の染色体遺伝子欠陥により起こされる要求を染色体外遺伝体により抑え、培養の間の染色体外遺伝子の損失を少なくする；  
ことからなるものである。

さらに本発明は、自然突然変異による染色体欠陥の抑制が少ない宿主細菌の構築、および宿主細胞の染色体欠陥を補うDNA列が染色体外遺伝体の残りから別かれて宿主の染色体へ転移することができない染色体外遺伝子の構築を含む。

ここで使用するように、「発現ベクター」は、本明細書において「染色体外遺伝体」とも称し、プラスミド、バクテリオファージまたは宿主細菌には通常存在しない独立した分子または染色体と融合した遺伝子物質を意味する。バクテリオファージおよび他のベクター系または染色体へのDNA組込み体も当業者に対し本発明を説明するが、染色体外遺伝体はプラスミドであるのが好ましい。

さらに本発明は、形質転換細菌において所望の生成物（すなわち、DNA, RNA, ペプチドおよびタンパク質）を作る方法であって、次の工程からなる方法を提供するものである：

i) 細胞エンベロープの合成または維持に必要な構造的または機能的成分をコード化するDNA列とii) 前記所望の生成物をコード化する遺伝子とを含む複合染色体外遺伝体を提供し；

前記構造的または機能的成分に対する染色体遺伝子における欠陥を有する適当な宿主細菌を前記複合染色体外遺伝体で形質転換し；

適当な栄養培地中で形質転換した細菌を培殖し；  
そして

培養培地から所望生成物を回収する。

本発明はまた、形質転換細菌における所望生成物を作る方法を提供するものであり、この方法は、

細胞エンベロープの合成または維持に必要な染色体遺伝子に欠陥を有する細胞であって宿主細菌の染色体欠陥により起きる要求を抑制することができ、また前記所望生成物をコード化するDNA列をも含む複合染色体外遺伝体を含む細菌を適当な栄養培地で培養し；そして

前記培養培地から所望生成物を回収する；  
ことからなるものである。

適当な宿主細菌は、バチルス種または腸内細菌科種に属する細菌、たとえば枯草菌または大腸菌であるが、他の適当な細菌を使用することは当業者には明らかである。

#### 発明の詳細な記載

記載において、次の語が用いられる。

*dal*遺伝子:D,L-アラニンラセマーゼ遺伝子

*dal'* 遺伝子:D,L-アラニンラセマーゼ機能遺伝子（野生型）

*dal-1* 遺伝子：外来D-アラニンに対する要求を通常起こすD,L-アラニンラセマーゼ遺伝子において突然変異を有する遺伝子

*dal-*宿主:*dal*遺伝子における突然変異を有する宿主（ここで増殖のためにD-アラニンの外来供給を通常要求する）

*dal'*宿主：野生型*dal*遺伝子を有する宿主

*Dal'*宿主：外来D-アラニンに対する要求を持たない宿主

*Dal-*宿主：外来D-アラニンに対する要求を有する宿主

*Com<sup>R</sup>*:クロラムフェニコール耐性

*Kan<sup>R</sup>*:カナマイシン耐性

*Amp<sup>R</sup>*:アンピシリン耐性

*bla*:*Amp<sup>R</sup>*を起こすβ-ラクタマーゼ用遺伝子

*Cat*:*Cam<sup>R</sup>*を起こすクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ用遺伝子

*amyM*:マルトグニックアミラーゼ用遺伝子

多くの細菌の場合、増殖と分割の可能性は、凹所を支持する細胞エンベロープ（すなわち、細胞膜、細胞壁および関連構造分）による。エンベロープの破裂または崩壊、一般に溶解または増殖の停止につながる。

枯草菌および他の多くの細菌において安定な細胞エンベロープに関する成分の1つのD-アラニンである。

D-アラニンは細胞壁の必須成分であり、多糖鎖を架橋してこれにより細胞壁へ必要な堅さを付与する働きをする。D-アラニンは多くの一般的な増殖培地には存在せず、普通は、枯草菌および大腸菌のような多くの細菌が酵素D,L-アラニンラセマーゼを用いてL-アラニンからこのアミノ酸を合成して、増殖のためにD-アラニンの外部供給を必要としない。突然変異体の中には、たとえば突然変異によってD,L-アラニンラセマーゼ遺伝子が損なわれた枯草菌の*dal-1* 突然変異体のように、増殖のためにD-アラニンの外部供給を必要とするものもある「フリーズら (Freese et al.) , プロシーディング

オブ ナショナル アカデミイ オブ サイエンス、51:1164-72, 1964, デュルラ (Dul et al.), ジエイ. バクテリオール (J. Bacteriol.), 15:1212-14, 1973」。他の突然変異体も細胞エンベロープの維持のために他の代謝物、たとえばジアミノピメリン酸、D-グルタミン酸およびN-アセチルグルコサミンの外部供給を必要とするものもある。

本発明によれば、*dal'* 遺伝子がプラスミドから染色体へ転移することができず、宿主の*Dal'* 表現型への自然突然変異の頻度がわずかで、そして細胞が外来D-アラニンを利用しない場合には、D,L-アラニンラセマーゼ機能遺伝子を有するプラスミドが*dal-*宿主においてそれらの維持を確保するということが証明された。

すなわち、適当な*dal'* プラスミド中に所望産物の遺伝子を挿入し、このプラスミドを適当な*dal-*宿主中で培養することにより、*dal'* プラスミドは増殖の間細胞集団中に維持され、プラスミドの自律的複製の間に表われる所望産物の高収率を確保する。多くの通常の増殖培地にはD-アラニンがないので、これら培地へさらに制限を加えることはない。

したがって、本発明は、培養の間に所望産物の遺伝子を有する染色体外遺伝体を安定化する便利な方法を提供するものである。

宿主の*Dal'* 表現型への自然突然変異の割合がわずかであることを確実にするために、*dal*遺伝子の一部を欠失することが必要であることもある。

しかしながら、このような*Dal'* 表現型の表現に必要な*dal*遺伝子の一部を欠失した宿主を、完全な*dal'* 遺伝子および染色体欠失部の両端に側面を接するDNAと相同の部分とを含む*dal'* プラスミドと組合わせることにより、プラスミドから染色体への*dal'* 対立遺伝子の転換が相同交差 (homologous crossover) により起きる。このような相同交差を避けるために、染色体中の*dal*遺伝子と側面を接する部分へ*dal*欠失部を延長するように宿主を構築する。また、染色体中の欠失部の両端に側面を接するDNAと相同のDNAではなく機能的*dal'* 遺伝子を有するようにプラスミドも構築する。この後者のプラスミドを前者の*dal-*宿主と組合させて好ましい宿主ベクター対を構成する。

これに代わり、組換え体欠失宿主を用いるかまたは宿主細菌の染色体と相同的DNAなしでもしくは少量とともに染色体外遺伝体*dal'* を用いるかのいずれかにより、*dal'* 対立遺伝子の転換を防ぎうる。

*dal'* 遺伝子は、後にさらに詳述するように、枯草菌から導びくのが好ましい。*dal'* 遺伝子に加えて、プラスミドは、プラスミド複製のための部分、たとえばバチルス菌または他のグラム陽性菌における複製のために高速コピープラスミドpUB110からの複数機能または腸内細菌科もしくはグラム陰性菌における複製のためにpBR322の複製機能をも含む。

本発明による所望産物の製造は、それ自身のプロモーターにより表現されるバチルス菌 (NCIB11837) からマルトゲニックアミラーゼを作ることにより説明される。本発明により作られる所望産物の他の例は、アミラーゼ、アミログリコシダーゼ、ブルナーゼプロティナーゼ、リバーゼ、ホルモン、および他の酵素または真核性タンパク質およびペプチドである。

本発明を添付の図面を参照してさらに説明する。第1図は、プラスミドpDN 691, pDN 770, pDN 820およびpDN 1050の構築を表わし、

第2図はpDN 1122の構築を表わし、

第3図はプラスミドpDN 1090, pDN 1120, pDN 1222およびpDN 1277の構築およびpDN 1000の制限酵素部位の地図を表わし、

第4図はプラスミドpDN 1130およびpDN 1290の構築を表わし、

第5図はプラスミドpDN 1274の構築を表わし、

第6図はプラスミドpDN 1800の構築を表わす。

本発明方法は、抗生物質を含まない培地中で形質転換細菌の培養を行なうことができるようにするものである。しかしながらこれは本発明の操作上の条件ではなく単にその結果であるということは理解されるであろう。抗生物質存在下に本発明の形質転換細菌を培養することが好ましいかまたは有用であるならば、勿論そのようにすることができる。

#### 詳細な説明

*dal<sup>1</sup>* は、枯草菌168に由来するDN497から得られる「スピジーゼン (Spizizen) 、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. 44, (1072-78, 1958) ]。染色体DNAは適当な制限酵素を完全に消化し、クロラムフェニコールとカナマイシンに対する耐性を与え、枯草菌において複製しうるプラスミドpDN 691と連結する。連結したDNAを、D-アラニン要求の相補性を選択するD-アラニン要求性枯草菌*dal-1*へ形質転換する。付随的に*Cam<sup>R</sup>* (クロラムフェニコール耐性) になった*Dal<sup>r</sup>* 形質転換細胞は、*Dal<sup>r</sup>* と*Cam<sup>R</sup>* 表現型が連結したpDN 691由來の組換えプラスミドを含有する。多分、染色体とプラスミド間の相同組換えのためであろうが、非常にわずかの量のプラスミドが形質転換細胞中に検出されることもある。

プラスミドの染色体への組換えとそれに続く組込みを避けるために、この*Dal<sup>r</sup>* *Cam<sup>R</sup>* 形質転換細胞からプラスミドを調製し、*Dal<sup>r</sup>* を選択するD-アラニン要求性で組換え欠失株DN733 *dal<sup>r</sup>* *recE<sup>r</sup>* に形質転換する。形質転換細胞は付随的に*Dal<sup>r</sup>* *Cam<sup>R</sup>* と*Kan<sup>R</sup>* (カナマイシン耐性) になる。

形質転換細胞は約16Kbの少量のプラスミドを含む。このプラスミドから、*Dal<sup>r</sup>* 表現型を与える2.0Kb *ClaI-SpH1* 断片を、*Cam<sup>R</sup>* *Dal<sup>r</sup>* 選択性DN 608:*dal<sup>r</sup>* 株におけるプラスミドpDN 820:*Cam<sup>R</sup>* 中の2.6Kb断片にクローン化すると

4.6Kbの組換えプラスミドpDN 1000が得られる。しかしながらこのプラスミドは相同組換えによる*dal<sup>r</sup>* 対立遺伝子で組換え可能な株の染色体 (たとえばDN 608) における*dal-1* 突然変異体と置き換えることができ、付随的*Com<sup>R</sup>* 選択性を有することのない*Dal<sup>r</sup>* 表現型の選択性はプラスミドの維持をこれ以上保証しないであろう。

相同組換えによる*dal<sup>r</sup>* 対立遺伝子の染色体への転移とそれに続くプラスミドの損失を避け、*Dal<sup>r</sup>* 表現型を生じる突然変異の頻度を減らすために、宿主の*dal* 遺伝子と

10 隣り合う部分の両方の欠失を宿主染色体で行ない、クローン化*dal* 遺伝子を制限酵素*EcoR I* と*EcoR V* で切断し、次いでエキソヌクレアーゼ*Bal 31* を消化する。消化混合物を連結し、*Cam<sup>R</sup>* 選択性結合DN 608 *dal<sup>r</sup>* へ形質転換する。*dal* 遺伝子中に欠失を有するプラスミド含有形質転換体は*Dal<sup>r</sup>* *Cam<sup>R</sup>* として固定される。*dal* 遺伝子に適当な欠失を有する宿主株を作るために*dal<sup>r</sup>* 宿主を欠失プラスミド、pDN 1274 *Com<sup>R</sup>* *dal<sup>r</sup>* の1つと形質転換させる。

*Cam<sup>R</sup>* 選択性の約0.1%形質転換体は*Dal<sup>r</sup>* であり、これは多分染色体*dal<sup>r</sup>* 遺伝子が相同組換えによりpDN 1274から*dal<sup>r</sup>* 欠失で置き換えたためであろう。D-アラニンの存在下でクロラムフェニコール不在下に増殖すると自然にpDN 1274が失なわれ、その後もプラスミド不含有株DN 1280は*Dal<sup>r</sup>* のままである。DN 1280からの染色体DNAのサザン法分析によれば、実際これは予期した*dal* 欠失を有することがわかる。この*dal<sup>r</sup>* 欠失宿主、DN 1280株は、完全な*dal<sup>r</sup>* 遺伝子および染色体における欠失部の両端に接するDNAと相同的部分の両方を有する*dal<sup>r</sup>* プラスミド (たとえばpDN 1090) で形質転換する。したがって、相同組換えにより*dal<sup>r</sup>* 遺伝子のプラスミドから染色体への転移が起こることができ、宿主が*dal<sup>r</sup>* へ転換することができる。それゆえ、プラスミドの維持はもはや*Dal<sup>r</sup>* 表現型に対する条件でなく、プラスミドはしばしば消失する。次いで、上述したように宿主染色体の欠失部と接するDNAと相同的DNAではなく完全な*dal<sup>r</sup>* 機能遺伝子を有する*dal<sup>r</sup>* プラスミド、pDN 1277を作る。したがって、pDN 1277を用いた*dal<sup>r</sup>* 欠失宿主の形質転換と同時に相同組換えにより*dal<sup>r</sup>* のプラスミドから染色体への転移が起こらない。それゆえ、DN 1280は、D-アラニンを含まない培地中で、通常は染色体中で*dal* 遺伝子と接するがDN 1280では欠失された*EcoR V* 部位を含むDNAを有しない*dal<sup>r</sup>* プラスミドに対し適当な*dal<sup>r</sup>* 宿主である。

化学的または商業的に興味のあるクローン遺伝子が実際に上述の宿主ベクター系によりD-アラニン不含有培地中でプラスミドに保持されることを確認するために、バチルスC 599 (NCIB 11837) からのマルトゲニックアミラーゼに対する遺伝子を*dal<sup>r</sup>* プラスミドへ転移させる。2つのプラスミドpDN 1130とpDN 1290を作る。2つのプラスミドは両方ともプラスミドpUB 110の複製機能と機能*dal* および*amyM* 遺伝子を有する。いずれのプラスミドもいかなる抗生物質に対しても耐性を与えない。ブ

ラスミドpDN 1130とpDN 1290を上記枯草菌株DN 1280へ形質転換する。DN 1280株は、上述したように、*Dal<sup>t</sup>*表現型の表現に必要な*dal*遺伝子の一部と*Dal<sup>t</sup>*表現型に必要ではない隣接部分であって*dal*遺伝子の一部であるかそうでない部分の両方を含む染色体欠失を有する。欠失の後の部分はpDN 1290には含まれていない。したがって、*dal<sup>t</sup>*遺伝子は二重相同組換えによりpDN 1290から染色体へ転移することはできない。一方、プラスミドpDN 1130は染色体中で欠失した完全な部分と隣接部分の両方を有する。このため、*dal<sup>t</sup>*遺伝子のプラスミドから染色体への転移とそれに続くプラスミドの消失が生じうる。

得られた形質転換株DN 1297 (=DN 1280 pDN 1130) とDN 1300 (=DN 1280 pDN 1290) を、培養の間のプラスミド安定性について試験する(実施例7参照)。DN 1297を培養すると染色体において*dal<sup>t</sup>*遺伝子を復元する相同交差が起こり、プラスミドとAmy<sup>t</sup>表現型の両方ともがしばしば消失する。

DN 1300を培養すると、D-アラニン不含有培地での増殖時にプラスミドで与えられるAmy<sup>t</sup>表現型の消失は見られない。しかしながら、D-アラニンを培地へ加えると、細胞はしばしばプラスミドを失くし、Amy<sup>-</sup> *Dal<sup>t</sup>*になる。すなわち、商業的に興味のある非本来的遺伝子を有するプラスミドが抗生物質を含まない培地中に安定に維持されることが示される。

プラスミドがまたD-アラニン要求性を抑えることによりグラム陰性菌中でも維持されることを示すために、枯草菌の*dal*遺伝子をD-アラニン要求性大腸菌突然変異体におけるプラスミド中でクローン化し、この要求性を補うことが示された。

次の実施例により本発明の詳細をさらに説明する。

### 実験

プラスミドと染色体DNAの調製および枯草菌と大腸菌の形質転換は、次の一般的手法により行なわれる。制限酵素の消化、Bal 31ヌクレアーゼ処理、オリゴ-DNA-リンカー挿入およびDNAのT4-リガーゼを用いた連結は、供給者により示された条件下で、ニューイングランドバイオラボズ(New England Biolabs)からの酵素を用いて行なわれる。

### 菌株

すべての枯草菌株は、彼草菌168(スピジーゼン、プロシーディング オブ ナショナル アカデミイ オブ サイエンス, 44:1072-78, 1958)の誘導体である。RUB 200:aro I 906, amy E07, amy R2は、ドクター フランク ヤング(Dr. Frank Young)、ユニバーシティ オブ ロchester(University of Rochester)、ニューヨークから得た。SL 438:trpC2(胞子形成およびプロテアーゼ欠失)は、ドクター キム ハーディ(Dr. Kim H ardy)、バイオジェン(Biogen)、ジュネーブから得た。DN 497:amy E07, amy R2は、SL 438からの染色体DNAを用いたこRUB 200のaro<sup>t</sup>形質転換体であり、QB 1133:a

ro I 906, met 85, sac A321, amy Eはドクター ジョージ ラポポート(Dr. Georges Rapoport)、IRBM、パリから得た。QB 1130:dal, met B5, sac A 331, amy Eは、バチルス ジェネティック ストック センター(Bacillus G enetic Stock Center)、コロンバス、オハイオから得た。DN 608:dal-1, met B, sac A, amy Eは、QB 1130からの染色体DNAを用いたQB 1133のaro<sup>t</sup>形質転換体である。MT 120:1en B6, rec E4 r<sub>m</sub><sup>-</sup> m<sub>r</sub><sup>-</sup>は、ドクター テルオタナカ(Dr. Teruo Tanaka)、三菱化成生命化学研究所、東京から得た。DN 773:dal-1, may E, rec E, sac Aは、MT 120からの染色体DNAを用いたDN 608のmet<sup>t</sup> rec E形質転換細胞である。DN 606はプラスミドpUB 110で形質転換されたDN 608である。

大腸菌株TKL 10:thr-1 leuB6, cod A1, trp-64, pyr F 101, nis 108, thy A6, arg G66, ibv A634, thi-1, alr-1, deoc1, lacy1, ton A21, tsx 95, sup E44(ウイズマン(Wijsman)、ジェネット・レス・キャムブ(Nett. Res., Camb.) 20:269-77, 1972)は、ドクター バーバラ バックマン(Dr. Barbara Bachmann)ザイコリ ジェネットイック ストック センター(the E. coli Genetic Stock Center)、コネチカット, U.S.A (CGSC 5466)から得られる。

### プラスミド

2.7KbのpUC9はアンピシリン耐性であり、pBR 322から誘導される「ヴィエイラ(Vieira)ら、ジーン(Gene) 19:259-68, 1982」。4.4KbのpBR 322はアンピシリンとテトラサイクリンに対し耐性を与える「ボリヴァー(Bolivar)ら、ジーン(Gene) 2:95-113, 1977」。

プラスミドpUB 110とpBD 64「グリクツアン(Grycza n)ら、ジェイ・バクテリオール(J. Bacteriol.) 134:3 18-329, 1978およびグリクツアンら、ジェイ・バクテリオール(J. Bacteriol.) 141:246-53, 1980)は、それぞれ枯草菌株BD 366とBD 624から単離される。pUB 110とpBD 64は両方ともカナマイシンに耐性を与え、pBD 64はまたクロラムフェニコールに耐性を与える。枯草菌株BD 366とBD 624はバチルス ジェネティック ストック センター(Bacillus Genetic Stock Center)、コロンバス、オハイオ、米国から得られた(株のファイル番号BGSC 1E6および1E22)。7.6KbのプラスミドpDN 452はクロラムフェニコールとカナマイシンに耐性を与え、枯草菌NCIB 11837からのマルトゲニックアミラーゼに対する構造遺伝子を有する。pDN 452の構築はEP特許出願第84301994.4に記載されている。

### I. 枯草菌の形質転換

コンピテント枯草菌細胞は、ヤスビン(yasbin)らにしたがって調製される(ジェイ・バクテリオール(J. Bacteriol.) 121:2 96-304, 1975)。次いで遠心分離(700rpm, 3分間)により細胞を集め、20%グリセロールを含む上清液の容量に再懸濁させ、液体窒素で凍結し、-70℃で貯蔵する。形質転換のために、凍結細胞を42溶かし、1容量の

緩衝液と混合する(0.4%グルコース、0.04M MgCl<sub>2</sub>および0.002M EDTAを有するスピジーゼンの最小培地(スピジーゼン、プロシーディング オブ ナショナル アカデミイ オブ サイエンス、USA 44:1072-78, 1958))。DNAを加え混合物を20分間37°Cで振とうしながらインキュベートする。次いで細胞を適当な選択培地上にプレートする。

## II. 大腸菌の形質転換

LB (10g バクト トリプトンBacto tryptone, 5g バクト 酵母抽出物および10g NaCl/l (水), pH7.0) にて大腸菌K-12株No. 802を一晩培養したものを500ml LB 中で100倍に希釈し、37°CでOD<sub>660</sub>=0.4まで増殖する。培養物を急冷し、15分間氷中に放置し、15分間3000rpm で回転させ「ソルバール (Sorvall) GS3ローター」、冷 0.1M CaCl<sub>2</sub> 200ml中に再懸濁させ、20分間氷に放置し、10分間3000rpmで回転させ、冷0.1M CaCl<sub>2</sub> 5ml中に再懸濁させ、20時間氷に放置する。次いで冷グリセロールを10%まで加え、液体窒素中でアリコートを凍結し、-70°Cで保存する。凍結細胞を氷中で溶かし、DNAを加え、混合物を氷中で45分間、37°Cで2分間インキュベートし、次いで適当な選択培地上にプレートする。

## III. 大腸菌からのプラスミドの調製

250ml LB, 0.4%グルコースおよび適当な抗生物質中で大腸菌を一晩増殖させる。遠心分離により細胞を採取し、4ml緩衝液1 (0.025Mトリス・HCl, pH=8.0, 0.01MEDTA, 0.05Mグルコース, 2mg/mlリゾチーム) に再懸濁させる。懸濁液を0°Cで15分間インキュベートし、次いで8ml緩衝液2 (0.2M NaDH, 1%SDS) と混合する。次いで6ml緩衝液3 (3M NaAセテート, pH=4.8) を加え、混合物を60分間0°Cに保ち、続いて20分間19000rpm (ソルバールSS34ローター中約45000g) で遠心分離する。上清液を0.6容量の冷イソプロパノールで沈殿させ、1.2ml 5TE (0.05M トリス・HCl, pH=8.0, 0.005M EDTA) と20μl 沸とうRNアーゼA (ペーリンガー) (2mg/ml) に再懸濁させる。30分後、溶液を、VTi65試験管中で、4.0ml緩衝液4 (80g CsClと56ml 5TE) と0.1ml EtBr (10mg/mlエチジウム ブロミド) の上面に層状にする。混合物を20時間45000rpmで遠心分離する。次いでプラスミドをこの試験管から除き、透析し、VIで記載するように抽出する。

## VI. 枯草菌からプラスミドの調製

大腸菌株について記載したように(III参照) ただし次の変法によりプラスミドを調製する。0.01Mリン酸カリウム, pH=7.0と適当な抗生物質(たとえば6 μg/mlクロラムフェニコール)と、必要ならば100 μg/ml D-アラニンを含むLB中で増殖を行なう。採取後、細胞をリゾチームとともに37°Cでインキュベートする。緩衝液2の代わりに、緩衝液2の1容量と緩衝液5 (0.2Mグリシン、0.2M NaClおよび1% SDS) 3容量の混液を用いる。以後の工程はIIIと同じである。

## V. 枯草菌からプラスミドの少量調製

LB (0.01Mリン酸塩pH=7.0と適当な抗生物質および必要ならばD-アラニン) における5ml枯草菌からのプラスミドを次に記載したこと以外はIVにより調製する: 1: 緩衝液の容量を4倍に減少する。2: 緩衝液3の後で0.5mlフェノールと0.5mlクロロホルムを加える。3: 19000rpmで遠心分離後、上清液をエタノールで沈殿させ、400 μl 緩衝液6 (0.05Mトリス・HCl pH=8.0, 0.1M NaAセテート) に再懸濁させ、プラスミドを再び沈殿させ、10 400 μl 緩衝液6に再懸濁させ、沈殿させ、洗浄し、100 μl TE (0.01Mトリス・HCl pH=8.0, 0.01M EDTA) と1 μg/ml沸とうRNアーゼA (ペーリンガー) 中で再懸濁させる。

## VI. 枯草菌から染色体DNAの調製

約50ml培養物からの凍結細胞のペレットを1.1ml緩衝液 (0.05Mトリス・HCl pH=7.4, 0.1M NaCl, 25%ショ糖) に再懸濁させる。100 μl リゾチーム (25mg/ml) と150 μl EDTA (0.5M, pH=8.0) を加える。混合物を37°Cで30分間インキュベートする。2ml 0.2% SDSを加え、20 °Cで30分間インキュベートする。混合物0.95mlにつき1g CsClと0.05ml EtBr (10mg/ml) を加え、VTi65ローター (ベックマン) 中で混合物を45000rpm, 15°Cで20時間遠心分離する。

DNAを波長UVランプ下におき、洗浄器で試験管を穿孔することにより除く。EtBrをイソプロパノールで抽出し、溶液を2時間TEE (0.01M トリス・HCl pH=8.0, 0.01MEDTA) に対し透析する。次いで溶液をTEEで8mlまで調節し、フェノールで2回およびクロロホルムで1回抽出する。0.1M NaClと冷エタノールでDNAを沈殿させ、1ml TE (0.01Mトリス・HCl pH=8.0, 0.001MEDTA) に溶かす。染色体DNAの溶液を4°Cに保つ。

### 〔実施例〕

#### 実施例1

##### プラスミドpDN 1050の構築(第1図)

プラスミドpBD64を制限酵素EcoR 1とSph 1で切断し、3.6Kb断片を大腸菌プラスミドpBR 322からの0.56Kb Eco R1-Sph1断片と連結する。得られた4.2KbのプラスミドpDN 691はクロラムフェニコールとカナマイシン耐性を与える。pDN 691の0.4Kb Hind 3-BamH 1断片を大腸菌プラスミドpUC 9の0.02Kb Hind 3-BamH 1で置き換える。得られた3.8KbプラスミドpDN 720はクロラムフェニコールとカナマイシン耐性を与える。

pDN 720の2.8Kb NcoI-NcoI断片をpDN 770の1.8Kb Nc oI-NcoI断片で置き換える。3.6KbのpDN 770はpBD 64の自然欠失であり、クロラムフェニコール耐性を与える。得られた2.8KbのプラスミドpDN 820はクロラムフェニコール耐性を与える。pDN 820は1つのHgiA 1部位が開放し、30°Cで30秒間Bal31を消化し、これにより0.1Kbの断片を除去する。得られた直線状断片を、ニューイングランド ヌクレア (No. 1001) からのBgI2オリゴヌクレ

オチド リンカーと連結する。Bg12リンカー1個を有しクロラムフェニコール耐性を有する2.7KbのプラスミドpDN 1050が、この連結混合物から単離される。

#### 実施例 2

##### プラスミドpDN 1122の構築（第2図）

クロラムフェニコールとカナマイシンへの耐性を与える、バチルス菌C599のマルトグニックアミラーゼに対する構造遺伝子amyMを有する7.6KbのプラスミドpDN 452にAvalを消化させ、エキソヌクレアーゼBal31で処理し、EcoR 1オリゴヌクレオチド リンカー（バイオラボNo. 1004）を凍結させ、EcoR 1を消化させ、T4-リガーゼを凍結させ、Cma<sup>I</sup>選択性枯草菌DN 497.amy Eへ形質転換させる。1個のAmy<sup>r</sup>形質転換細胞は6.6Kbのプラスミドp520-20を含む。p520-20aアミラーゼ収率は少なくともpDN 452の収率ほどである。

次いで、p520-20の2.7Kb Nco1-Nco1断片をpDN 770の1.7Kb Nco1-Nco1断片（実施例1のように調製）で置き換える。得られた5.6KbのプラスミドpDN 808はamyMを有し、クロラムフェニコールに対する耐性を与える。

pDN 808の2.6Kb Eco1-Sph1断片をpDN 1050の2.4EcoR 1-Sph1断片（実施例1で調製）で置き換える。得られた5.4KbのプラスミドpDN 1122はamyMを有し、クロラムフェニコールに対する耐性を与える。

#### 実施例 3

##### dal遺伝子のクローニング

枯草菌株DN 497由来の染色体DNA約3μgとプラスミドpDN 691Cam<sup>R</sup> Kan<sup>R</sup> 1μgに制限酵素Bam 1とSph1を完全に消化させる。染色体とプラスミドDNAを混合し、T4-リガーゼを連結し、DN 606:dal<sup>-</sup> pUB 110:Kan<sup>R</sup>へ形質転換する。約200のDal<sup>r</sup>形質転換細胞のうち、Dal<sup>r</sup>表現型がpDN 691由来の組換えプラスミドと連結することを示唆するように、1つがCam<sup>R</sup>になる。このDal<sup>r</sup> Cam<sup>R</sup>形質転換細胞からプラスミドが調製され、Dal<sup>r</sup>選択性のDN 773 dal<sup>-</sup> recE<sup>-</sup>株へ形質転換する。これに付随してDal<sup>r</sup>形質転換細胞はCam<sup>R</sup>とKan<sup>R</sup>になる。形質転換細胞は非常に少量の16Kbプラスミドを含有するだけである。

このプラスミドから、Dal<sup>r</sup>表現型を与える2.0Kb Cla1-Sph1断片をDN 608:dal<sup>-</sup>株のプラスミドpDN 820のCla1とSph1部位にてクローニングし、組換えプラスミド、4.6KbのpDN1000が得られる。

pDN1000における制限酵素部位の地図を第3図に示す。形質転換細胞株DN 1000=DN 608 pDN 1000を、1984年12月7日に、ナショナル コレクション オブ インダストリアル バクテリア (NCIB)、トリー リサーチ

ステーション、アバディーン、スコットランドに寄託し、整理番号NCIB 12029が与えられた。NCIBは977年のブタペスト条約で権限を与えられた国際的寄託機関で、この条約のそれぞれ第9条および第11条にしたがって寄託の永続性と公衆によるこれの入手可能性をはかるものである。

次の観察により、クローニング化染色体断片が実際にdal遺伝子（dal<sup>-</sup>突然変異体により定義）を含みD-アラニン要求性を抑えることのできる他の遺伝子を含まないことが確認された：

- 1: 染色体のdal遺伝子とクローニング化染色体断片の間の相同組換えを示すように、線状（非複製）プラスミドはCam<sup>R</sup>ではなくDal<sup>r</sup>に感受性のあるdal<sup>-</sup>に形質転換する。
- 2: 染色体においてdal<sup>-</sup>である宿主細菌から調製されるプラスミド約0.2%はdal<sup>-</sup>である（初期dal<sup>r</sup>プラスミドと区別のつかない制限酵素パターンを用いて）。染色体突然変異体が相同組換えによりdal<sup>-</sup>プラスミドへ形質転換したことが示すように、これらdal<sup>-</sup>プラスミドは染色体dal<sup>-</sup>突然変異体を補うことはできない。
- 3: 枯草菌染色体DNAのザザン法分析により、染色体Cla1-Sph1断片がpDN 1000からの同じ大きさの断片とハイブリッド形成することが明らかである。すなわち、pDN 1000におけるクローニングの前には何らの大きなdal遺伝子転位が生じなかった。

#### 実施例 4

##### プラスミドpDN 1130の構築（第3図および第4図）

dal<sup>-</sup>遺伝子を有するpDN 1000（実施例3から）はCla1部位が開放され、エキソヌクレアーゼBal 31を消化し、BamH 1オリゴヌクレオチドリンカー（バイオラボ、No. 1017）で連結される。得られたプラスミドpDN 1090はdal<sup>-</sup>遺伝子を有し、クロラムフェニコール耐性を与える。

pDN 1122（実施例2から）をSph 1とBg12で切断し、4.4Kb断片をpDN 1090の2.0Kb Sph 1-BamH 1断片で連結する。

- 得られたプラスミドpDN 1130はamyM<sup>r</sup>とdal<sup>-</sup>遺伝子を有するが、しかしクロラムフェニコール耐性を与えない。

#### 実施例 5

##### プラスミドpDN 1290の構築（第3図および第4図）

4.5KbのプラスミドpDN 1120 dal<sup>-</sup> Cam<sup>R</sup>は、Sph 1を消化したpDN 1000のエキソヌクレアーゼBal 31消化とBg12とSac1オリゴヌクレオチド リンカー（それぞれバイオラボ、No. 1001とNo. 1005）の両方の挿入により構築される。

- pDN 1110は1つのEcoR 5位で開放し、エキソヌクレアーゼがBal 31を消化し、2個のBg12オリゴヌクレオチド リンカー（バイオラボ、No. 1001）と連結する。リンカーと1個のプラスミド末端との融合によりBcl 1位を作る。得られたプラスミドpDN 1222はdal<sup>-</sup>遺伝子を有し、クロラムフェニコール耐性を与える。

- pDN 1222の0.7Kb Bcl 1-Bcl 1断片は、pDN 1090の3.5Kb BamHI-Bcl 1断片（実施例4）と連結する。得られた4.2KbのプラスミドpDN 1277はdal<sup>-</sup>遺伝子を有しクロラムフェニコール耐性を与える。プラスミドpDN 1277をDN 1280（実施例6参照）株へ形質転換し、得られたDN 1517 (=DN 1280 pDN 1277) 株をナショナル コレクシ

ヨン オブ インダストリアル バクテリア、トーリーリサーチ ステーション、アバディーン、スコットランドに、1984年12月7日付で寄託した。整理番号はNCIB 12030であった。

さらに、2.6Kb SphI-BamH I断片をpDN 1050（実施例1で記載したように調製）からの2.5Kb Sph I-BamH Iで置き換えることにより、pDN 1090を4.5KbのプラスミドpDN 1120dal<sup>t</sup> 枠着Cam<sup>r</sup>へ転換する。

pDN 1265 amyM<sup>r</sup> Cam<sup>r</sup> は、EcoR 5を消化したpDN 1120のBa131エキソヌクレアーゼ消化とそれに続くSph I消化により構築される。2.9Kbの断片を、SacIオリゴヌクレオチド リンカー（バイオラボ No. 1005）と、EcoR 1を消化しBa131エキソヌクレアーゼ処理により得られたpDN 1130の2.9Kb断片と連結し、次いでSph Iを消化する。

得られた5.8KbのプラスミドpDN 1265はamyM<sup>r</sup> を有し、クロラムフェニコールに対し耐性を与える。

次いで、SpnI-BglI2を用いてpDN 1265を切断し、4.7Kb断片をpDN 1277の1.6Kb SphI-BglI2断片と連結する。

得られた約6.3KbのプラスミドpDN 1290はamyM<sup>r</sup> とdal<sup>t</sup> 遺伝子を有するが、抗生物質耐性マーカーを有しない。

#### 実施例6

##### dal<sup>t</sup> 遺伝子欠失を有する宿主の構築（第5図）

クローナ化dal<sup>t</sup> 遺伝子における5 μgのpDN 1090を制限酵素EcoR 1とEcoR 5で切断し、次いでこの断片を60秒間エキソヌクレアーゼBa131で消化し、連結し、DN 608: dal<sup>t</sup> へ形質転換すると、プラスミドのDal<sup>t</sup> 表現型を破壊する欠失が得られる。これら欠失プラスミドpDN1274 Cam<sup>r</sup> dal<sup>t</sup> の1つを用いてDN 497株を形質転換しCam<sup>r</sup> を選択すると、染色体dal<sup>t</sup> 遺伝子がpDN 1274からのdal<sup>t</sup> 欠失で置換されたためであろうかDal<sup>t</sup> である形質転換細胞約0.1%が得られる。自然にpDN 1274が失なわれた後、形質転換細胞はCam<sup>r</sup> になるかDal<sup>t</sup> は残る。この株、DN 1280の染色体DNAのサザン法分析によれば、実際にこれが予期したdal<sup>t</sup> 欠失を有することがわかる。このdal<sup>t</sup> 欠失突然変異体のDal<sup>t</sup> 表現型への逆転を起こすかもしれない突然変異の頻度は10<sup>-3</sup>以下である。プラスミドpDN 1277=DN1517（実施例5参照）を有するDN 1280は寄託された。

#### 実施例7

##### dal<sup>t</sup> 宿主におけるdal<sup>t</sup> amyM<sup>r</sup> プラスミドの安定性

宿主-プラスミド組合せDN 1300 (=DN 1280 pDN 1290) の安定性および染色体欠失部と側面を接するプラスミドDNA列と染色体との重なりの欠落の重要性を示すために、次の実験を行なう：

DN 1297 (=DN 1280 pDN 1130) 株とDN 1300 (=DN 1280 pDN 1290) 株のコロニー1つを、10mMのリン酸カリウム緩衝液pH=7.0と0.2%グルコースを補充したL-ペプチドに再懸濁させる。それぞれの再懸濁液の半分を上記培地に接種し、残りの半分を200μg/ml D-アラ

ニンを補充した同一培地に接種する。100倍または1000倍のいずれかで培地を希釈し、培地中のD-アラニンの存在または不存在下のいずれも良好な風通しをして37℃で世代数に対して株が増殖する。各希釈物に対し、少なくとも10<sup>7</sup>個細胞が形質転換する。1日の期間をおいて、Amy<sup>r</sup> コロニー（全部で約100）の頻度を、増殖条件にしたがってD-アラニンを有するかまたは有しないL-ペプチドプレートで試験する。結果を第1表に示す。任意に選択した10個のAmy<sup>r</sup> コロニーにはプラスミドが見られなかった。

第1表：D-アラニン含有または  
不含有LB培地中で増殖後  
のAmy<sup>r</sup> 細胞の頻度

株	世代			
		プラスミド	51%	68Amy <sup>r</sup>
DN 1297	pDN 1130	2%	20%	—
DN1297+D-ala <sup>t</sup>	pDN 1130	60%	—	—
DN 1300	pDN 1290	0%	0%	0%
DN1300+D-ala <sup>t</sup>	pDN 1290	60%	90%	—

##### 1) D-アラニン含有下で最初に20世代

第1表の結果より、プラスミドpDN 1290は非選択的条件下（増殖培地へD-アラニンの添加）で非常に不安定であるが、選択培地（D-アラニンを添加せず）中で増殖すると安定になることがわかる。さらに、宿主染色体においてdal<sup>t</sup> 遺伝子を復原する相同的二重交差とこれに続くプラスミド損失はDN 1300（85世代に増殖後はAmy<sup>r</sup> 細胞なし）では起こらず、一方D-アラニン不含有培地中のDN 1297増殖の68世代後Amy<sup>r</sup> 細胞の頻度は20%であり、これはプラスミドから染色体へのdal<sup>t</sup> 遺伝子の転移とそれに続くプラスミドの損失によるものと考えられる。

#### 実施例8

##### プラスミドpDN 1800の構築（第6図）

pDN 1222の1.4Kb Bgl I-Bgl I断片（第4図参照）とpDN 1050の1.5Kb BamH I-BamH I断片（第3図参照）とを合わせてpDN 1284を構築する。

pDN 1284から、1.4Kb Bgl I-Sal I断片におけるdal<sup>t</sup> 遺伝子がBamH IとSal Iで切断された古典的大腸菌プラスミドベクターpBR 322へ転移する。組換えプラスミド、pDN 1800:Amp<sup>r</sup>（アンピシリン耐性）がAmp<sup>r</sup> 選択性大腸菌株TKL 10へ形質転換してDN 1800:pDN 1800株が得られる。DN 1800株は1985年11月22日にNCIBに寄託され整理番号NCIB 12181を付された。したがって、寄託の永続性と公衆による取得可能性が保証された（上記参考）。TKL 10は42℃でD-アラニン要求性表現型を示すがDN 1800においてはこの要求性は抑えられる。それゆえ、枯草菌のdal<sup>t</sup> 遺伝子を有するpDN 1800はアラニンラセマーゼ活性が欠失した大腸菌株にD-アラニン要求性を補うことができる。

## 【図面の簡単な説明】

第1図は、プラスミドpDN 691, pDN 770, pDN 820およびp

DN 1050の構築を表わす図式であり、

第2図はpDN 1122の構築を表わす図式であり、

第3図はプラスミドpDN 1090, pDN 1120, pDN 1122および

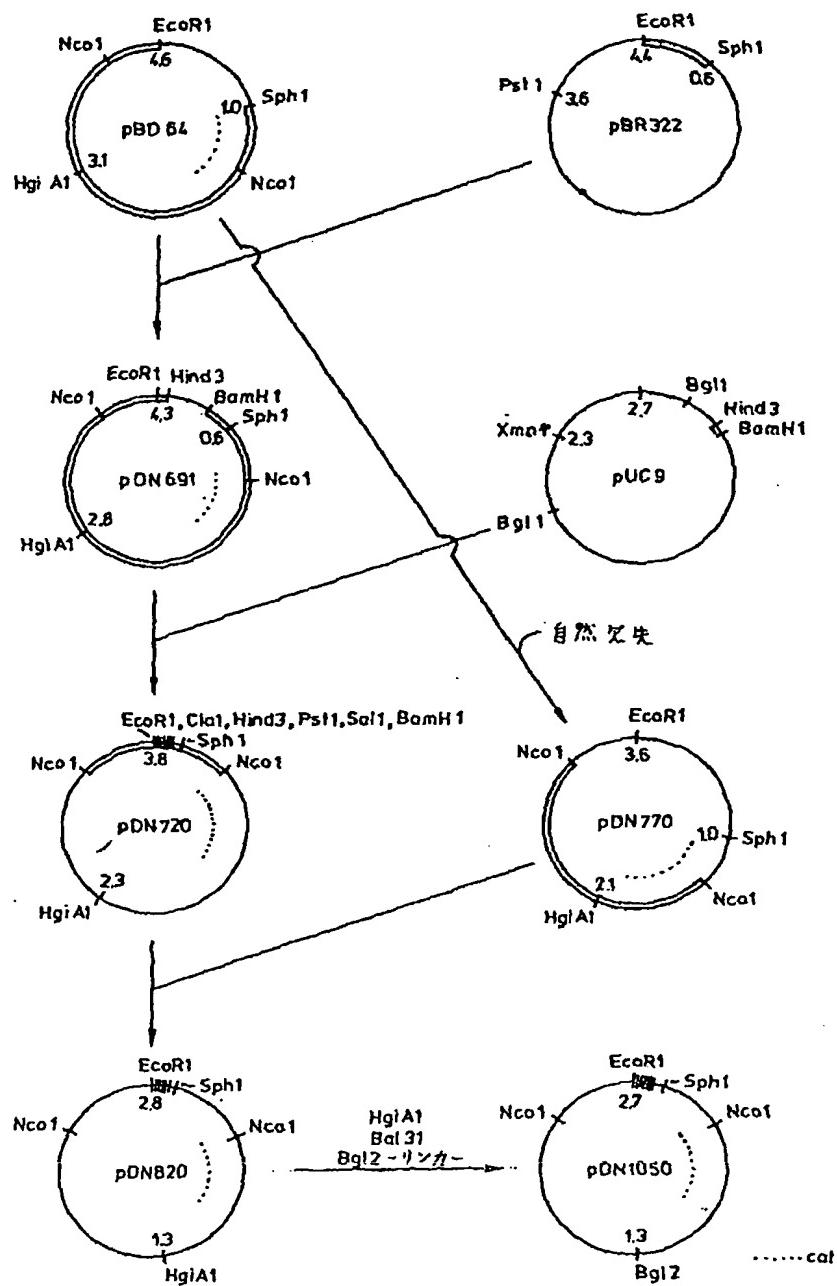
pDN 1277の構築およびpDN 1000の制限酵素部位の地図を表わす図式であり、

第4図はプラスミドpDN1130およびpDN1290の構築を表わす図式であり、

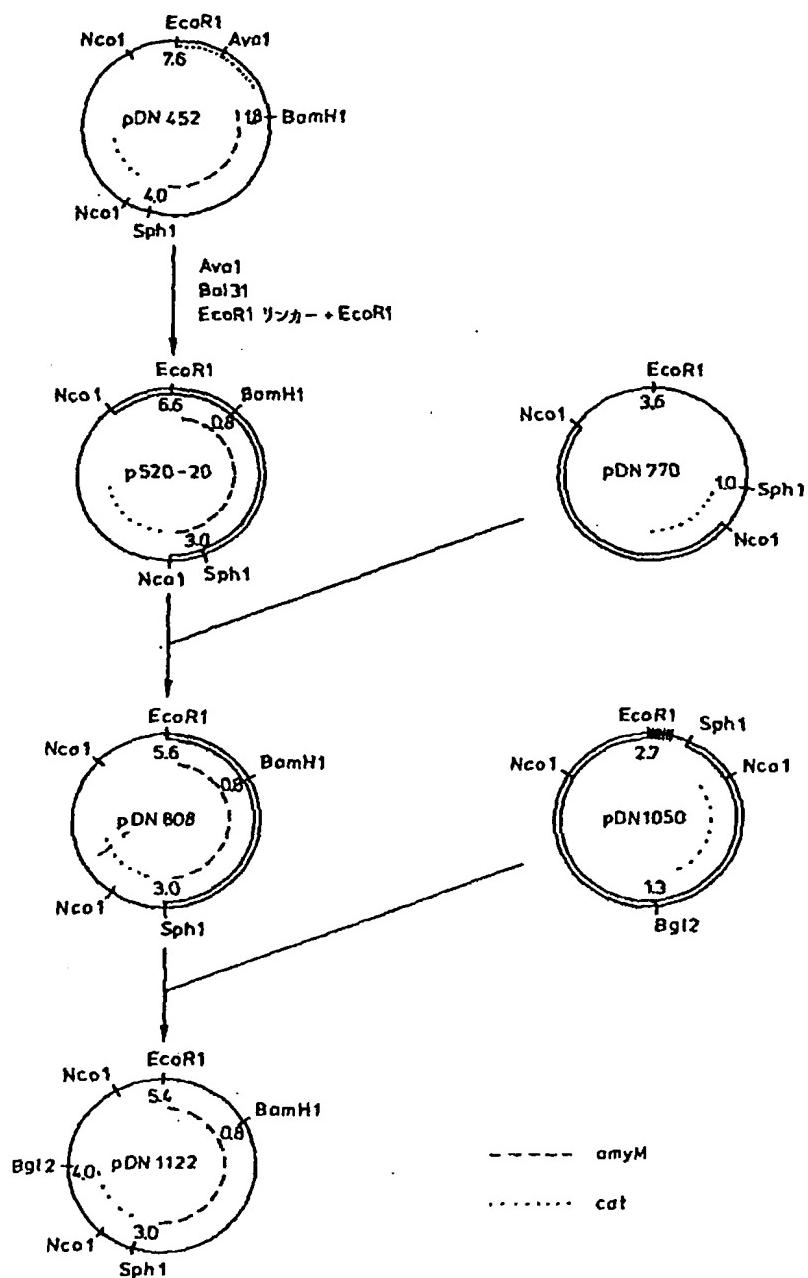
第5図はプラスミドpDN 1274の構築を表わす図式であり、

第6図はプラスミドpDN 1800の構築を表わす図式である。

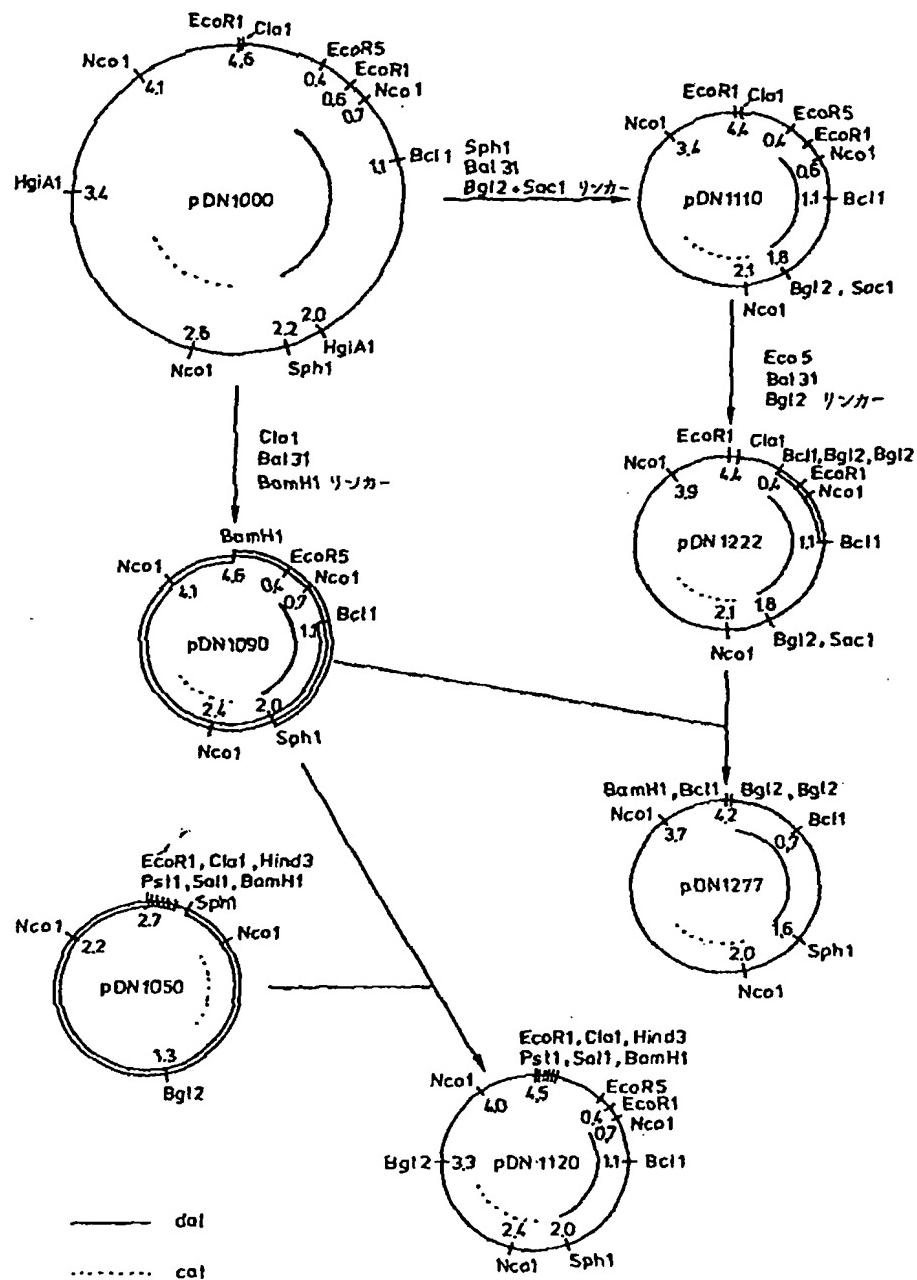
【第1図】



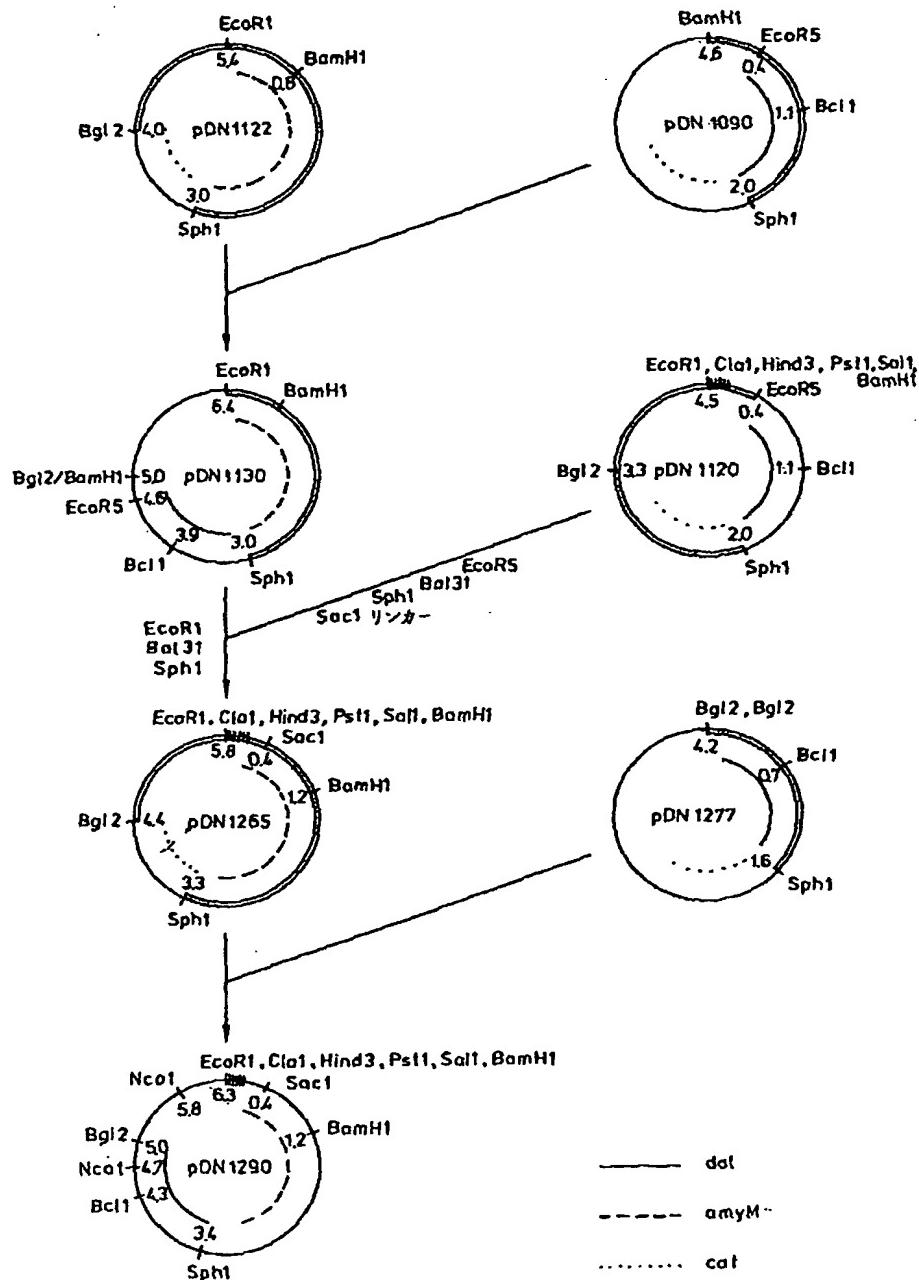
[第2図]



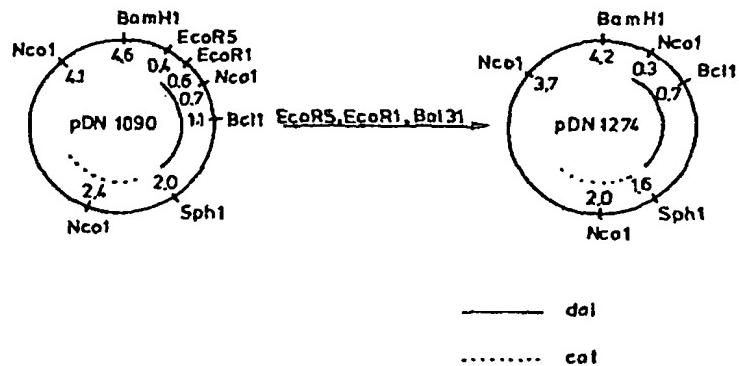
【第3図】



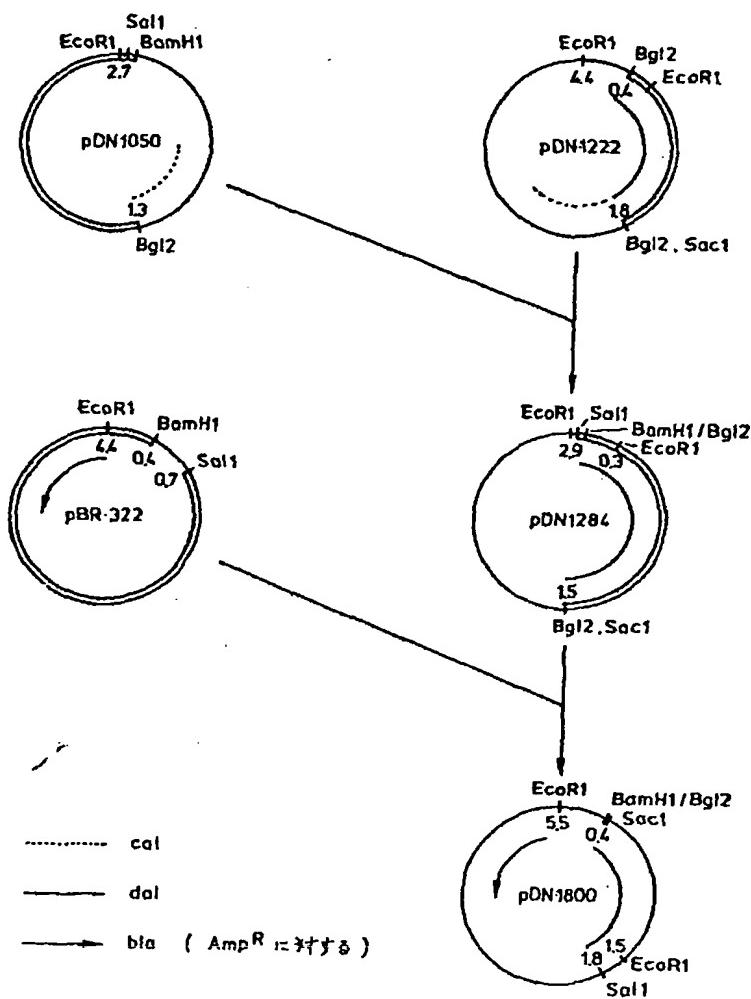
[第4図]



[第5図]



[第6図]



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所  
C12R 1:19 )

(56)参考文献 Biochemistry, 23 (22)  
) P. 5182-5187 (1984)  
J. Bacteriol., 153 (3)  
) P. 1439-1450 (1983)  
飯野徹雄等編「組換えDNA実験技術」  
(株) 学会出版センター発行 (1984  
. 6. 10) P. 61-72